

0716480-1

на правах рукописи

ДАВЫДОВ Рустам Энверович

УДК 577.152.277: 577.112.4: [577.322.2, 615.275]

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ
НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ
РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS***

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000709024

Казань - 2000

Работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии Казанского государственного университета имени В.И.Ульянова-Ленина.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,
профессор Б.М.Курниенко

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор, академик АН РТ
Д.М. Зубаиров

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
О.А. Чернова.

Ведущая организация

Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится "31" мая 2000 г. в 14³⁰ часов на заседании диссертационного Совета К 053.29.19 при Казанском государственном университете имени В.И.Ульянова-Ленина по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Автореферат разослан "___" _____ 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А. Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. К настоящему времени накоплен обширный материал по влиянию рибонуклеазы *Bacillus intermedius* на процессы жизнедеятельности клеток про- и эукариот. Показано, что рибонуклеаза *B.intermedius* способна вызывать различные биологические эффекты, как на уровне клетки, так и на уровне организма. Она обладает противовирусным, противоопухолевым и иммуностимулирующим действием - стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет, неспецифические факторы резистентности. Рибонуклеазы вызывают стимуляцию гемопоэза и стимуляцию пролиферации некоторых клеток высших эукариот [Куриненко, 1991]. В зависимости от концентрации РНКазы могут стимулировать или ингибировать размножение клеток микроорганизмов [Солдатова, Беляева, 1972; Добротина и др., 1992; Колпаков и др., 1989]. Использование фотоокисленной и инактивированной методом сайт-специфического мутагенеза рибонуклеазы *B.intermedius* позволило установить, что ряд биологических эффектов рибонуклеазы каталитически обусловлен: с наличием ферментативной активности связаны противовирусное действие рибонуклеазы, токсическое и генотоксическое действие, цитотоксичность рибонуклеазы, ростстимулирующее действие на микроорганизмы [Куриненко, 1991; Кипенская, 1998; Ильинская, 1998]. Известна гипотеза, объясняющая механизм биологического действия нуклеаз комплексным проявлением каталитической функции РНКаз, аффинным и неспецифическим взаимодействием с плазматической мембраной клетки [Куриненко, 1991]. Очевидно, что степень выраженности биологических эффектов фермента на клеточном уровне зависит от его способности к контакту с клеткой, который определяется совокупностью свойств плазматической мембраны клетки и физико-химических свойств фермента. Это предполагает, что изменение любого элемента указанной совокупности свойств, например, физико-химических свойств фермента, может существенным образом отразиться на эффективности его взаимодействия с клеткой, и, следовательно, на биологической активности фермента.

Одним из основных инструментов изменения физико-химических свойств белка является его химическая модификация. Данные, полученные при изучении зависимости биологической активности от структуры методами химической модификации используются для развития исследований на основе сайт-специфического мутагенеза. Химическая модификация интересна и с практической точки зрения: применение химической модификации позволило создать пролонгированные ферментные препара-

ты, препараты с измененными иммуногенными и аллергенными свойствами [Ларионова, Торчилин, 1982; Чазов и др., 1985; Максименко, 1988].

Все вышесказанное дает основание рассчитывать на плодотворность использования методов химической модификации для изменения физико-химических свойств РНКазы *B.intermedius* и, как следствие, изменения ее биологической активности.

Цель и задачи исследований. Целью исследования явилось изменение каталитически обусловленной биологической активности гуанилсцифичной РНКазы *B.intermedius* методами химической модификации.

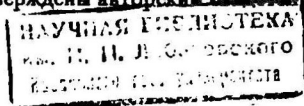
Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Разработать условия модификации препаратов РНКазы *B.intermedius* глутаровым альдегидом и диальдегиддекстраном, позволяющие получать препараты с высокими выходами по белку и высокой ферментативной активностью.
2. Исследовать энзиматические свойства, стабильность, гидрофобность и электрофоретическую подвижность препаратов РНКазы *B.intermedius*, модифицированных введением в молекулу фермента различных функционально-активных групп.
3. Изучить каталитически обусловленные цитотоксические свойства препаратов РНКазы *B.intermedius* с измененными физико-химическими и энзиматическими свойствами.

Научная новизна работы. Впервые показана возможность направленного получения модифицированных ферментов с заданным числом связей фермент-полимерный носитель с использованием носителя с одной степенью активации. Получены гидрофобизированные препараты РНКаз с высоким уровнем ферментативной активности.

Показано влияние изменения физико-химических свойств на каталитически обусловленную цитотоксичность модифицированной РНКазы *B.intermedius*. Показано, что цитотоксичность РНКазы *B.intermedius* возрастает при ее гидрофобизации - в большей степени при введении в молекулу фермента алкильных, а не ароматических радикалов. Увеличение цитотоксичности при гидрофобизации алкиламинами обусловлено не токсичностью последних, а изменением физико-химических свойств модифицированного фермента. Показано, что увеличение суммарного отрицательного заряда РНКазы *B.intermedius* сопровождается снижением цитотоксичности фермента, тогда как увеличение суммарного положительного заряда не оказывает влияния на цитотоксические свойства. Влияния изменения Касс модифицированного фермента с 3'-ГМФ на каталитически обусловленную цитотоксичность фермента не выявлено.

Результаты работы подтверждены авторским свидетельством об изобретении.



Практическое значение. Разработан способ получения модифицированных форм рибонуклеазы с разным числом связей фермент - полимерный носитель при использовании носителя с одной и той же степенью активации. Разработан способ увеличения гидрофобности фермента с сохранением высокого уровня ферментативной активности. Способы могут быть использованы для получения новых препаратов, применяемых в медицине и биотехнологии, в практике научных исследований. Полученный фотоокисленный нетоксичный препарат РНКазы *B.intermedius* может быть использован вместо нативного фермента для стимуляции каталитически независимых биологических эффектов.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были изложены на XV конференции FEBS (Брюссель, 1983); Всесоюзной конференции "Новые направления биотехнологии" (Пушино, 1984); I Всесоюзном симпозиуме по инженерной энзимологии (Кобулетн 1985); I международной конференции "Структура и химия рибонуклеаз" (Москва, 1989); на межреспубликанском совещании "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование" (Рига, 1989); Всесоюзной конференции "Методы получения, анализа и применения ферментов" (Рига, 1990); Втором съезде биохимического общества Российской академии наук (Пушино, 1997); XI Всероссийской конференции "Ферменты микроорганизмов" (Казань, 1998).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе получено авторское свидетельство об изобретении.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 12 таблиц, 13 рисунков. Список литературы содержит 171 наименование литературных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Объектом исследования служила электрофоретически гомогенная внеклеточная гуанилсцифичная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* (РНКазы Vi) [Голубенко, 1979] и ее производные, полученные путем химической модификации.

Диальдегиддекстран (ДАД) получен периодатным окислением декстрана (реополиглобулин, М.М. 35000) с помощью водной кислоты [Хомяков и др., 1965].

В работе использовали препарат глутарового альдегида (ГА) фирмы Sigma. Молекулярная масса препарата, определенная по гелю фильтрации составила около 300, что соответствует тримеру глутарового альдегида.

Число связей фермент-модификатор (ЧТС) определяли по разности в числе аминогрупп способных взаимодействовать с тринитробензолсульфокислотой (TNBS) у нативного и модифицированного фермента [Fields, 1971].

Количество остатков триптофана определяли с помощью титрования белка N-бромсукцинимидом [Голубенко и др., 1981].

Рибонуклеазную активность препаратов определяли по количеству кислото-растворимых продуктов, образовавшихся при ферментативном гидролизе дрожжевой суммарной РНК. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывает прирост оптической плотности при 260 нм на 1 опт.ед. за час инкубации. [Пещинская и др., 1980]

Для анализа полученных данных использовали понятие относительной ферментативной активности (ОФА): $ОФА = (\text{удельная активность модифицированного препарата}) / (\text{удельная активность нативного фермента})$.

Относительную константу ассоциации модифицированных препаратов с гуаниловым нуклеотидом (Касс) определяли относительно константы ассоциации нативной рибонуклеазы с помощью метода гель-фильтрации [Hummel, Dryer, 1962]; константу ассоциации фотоокисленной РНКазы Vi (РНКазы Vi_{ox}) с 3'-ГМФ рассчитывали из разностных спектров поглощения комплекса белка с нуклеотидом. [Голубенко, 1982]

Калориметрические измерения проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-1М [Privalov, 1980]

Термостабильность модифицированного фермента выражали как остаточную активность в процентах по отношению к исходной после прогрета препарата при 65°C в течение определенного времени. [Вудворд, 1988]

Поверхностное натяжение растворов препаратов РНКазы (σ) определяли стагмометрическим способом или методом взвешивания капель [Адам, 1947], концентрация препарата 0,2 мг/мл в 0,14 М NaCl, поверхностное натяжение 0,14 М NaCl 72,1 дин/см.

Относительную электрофоретическую подвижность модифицированных препаратов (Rf) определяли относительно подвижности нативной РНКазы Vi при электрофорезе на нитроцеллюлозной мембране "Тасма" N4 [Дэвени, Гергей, 1976].

Фракционный состав РНКазы, модифицированной глутаровым альдегидом, определяли электрофоретическим разделением препарата белка в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [Туркова и др., 1982]. Гель, после

окрашивания в кумасси синем R250 и отмывании в 7 % уксусной кислоте, сканировали на спектрофотометре U-40 (Германия). О количественном составе изучаемого препарата судили по площади соответствующих пиков.

Цитотоксические свойства препаратов РНКазы *in vitro* изучали на перевиваемой монослойной культуре клеток амниона человека линии FL. Для оценки цитотоксической активности использовали метод витального окрашивания клеток нейтральным красным [Finter, 1969].

Цитотоксические свойства оценивали с помощью двух показателей - удельной цитотоксичности и относительной цитотоксичности. Удельная цитотоксичность характеризует цитотоксичность ферментного бепка вне зависимости от его каталитической активности. Её рассчитывали на 1 мкг фермента по формуле:

$$УЦ = (100 - x) / (\text{количество фермента, мкг}) \text{ усл.ед/мкг фермента, где } x - \text{количество нейтрального красного, экстрагированного из клеточного моноспоя, выращенного в присутствии фермента, в процентах от контроля.}$$

Относительная цитотоксичность характеризует кратность изменения удельной цитотоксичности фермента вследствие его модификации. Её рассчитывали следующим образом: $ОЦ = (УЦ \text{ модифицированного фермента}) / (УЦ \text{ нативного фермента})$

Отношение ОЦ/ОФА отражает кратность различий в изменении цитотоксичности и каталитической активности фермента вследствие его модификации и рассматривается как синоним понятия относительной "каталитической цитотоксичности".

Цитотоксические свойства препаратов РНКазы *in vivo* оценивали в отношении клеток асцитной опухоли NK/Ly [Куринско и др., 1988]. Токсическое действие препаратов оценивали по торможению роста опухоли и средней продолжительности жизни животных.

Выход ионов калия под действием препаратов рибонуклеазы измеряли мембранным ионоселективным калиевым электродом ОР-К-0711Р (Radelsis, Венгрия) на суспензии живых клеток саркомы 37 [Атаудлаханов и др., 1984].

В работе все эксперименты были проведены не менее чем в пяти повторностях. Статистическая значимость различий между экспериментами рассчитывалась по критерию Стьюдента. Статистическая значимость различий соотношения ОЦ/ОФА определялась используя стандартное отклонение определенное по "закону сложения ошибок", число степеней свободы определялось по формуле Уэлча [Вознесенский, 1981]. Все статистические расчеты проводились для уровня значимости 0,05, досто-

верная разница между данными для модифицированного и нативного фермента отмечена в таблицах знаком *

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение модифицированных рибонуклеаз и их физико-химические и кинетические свойства

Оптимизацию процесса модификации РНКазы Vi диальдегиддекстраном проводили по методу Бокса-Уилсона [Напимов, 1965] с учетом формализованных выходных параметров. Выходной параметр Z определяли для каждого опыта по формулам:

$$Z = K_1 / K_2; \quad K_1 = 10^4 \times t_m^{-1} \times \ln(100/(100-b)); \quad K_2 = 10^4 \times t_i^{-1} \times \ln(100/a), \text{ где}$$

K_1 и K_2 при условии, что реакции связывания и инактивации имеют псевдопервый порядок по концентрации рибонуклеазы, будут пропорциональны константам скоростей связывания и инактивации, соответственно. Выходной параметр Z отражает соотношение параметров K_1 и K_2 ; t_m - продолжительность модификации РНКазы диальдегиддекстраном, мин; b - выход модифицированной РНКазы за время t_m в процентах; t_i - время инкубации нативной РНКазы с нативным декстраном при условиях модификации, мин; a - процент сохранения ферментативной активности нативной РНКазы за время инкубации t_i .

На основе анализа значащих коэффициентов регрессии для линейного приближения функций отклика (таблица 1) проведены опыты для движения в направлении градиента линейного приближения. После последовательной реализации всех этапов оптимизации предложены условия проведения реакции связывания рибонуклеазы Vi диальдегиддекстраном: pH реакционной смеси не существенен в интервале 7,0 - 8,5, температура модификации 40°C - 45°C, соотношение декстран/рибонуклеаза 8/1, степень активации декстрана 18-20, концентрация рибонуклеазы 2 - 3 мг/мл, дополнительное внесение NaCl для увеличения ионной силы не требуется.

Таблица 1

Оптимизация процесса модификации РНКазы Vi диальдегиддекстраном. Коэффициенты регрессии для линейных уравнений выходных параметров K_1 , K_2 , Z

Выходной параметр	Коэффициенты регрессии					
	pH	степень активации ДАД	ДАД / РНКазы	C РНКазы, мг/мл	T, °C	ионная сила
K_1	9,8	57,3	44,5	49,3	95,2	-36,5
K_2	3,58	-	0,0025 ^a	0,097 ^a	2,67	-1,035 ^a
Z	-0,57 ^a	4,32	3,28	4,07	6,30	-2,41

^a Коэффициент не значим, $p < 0,05$

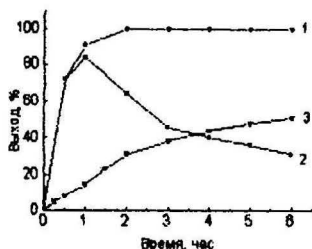


Рис.1. Выходные параметры реакции модификации РНКазы Vi диальдегиддекстраном в зависимости от времени модификации. 1-выход по бетку, 2- выход по активности, 3-доля вступивших в реакцию с диальдегидом аминогрупп

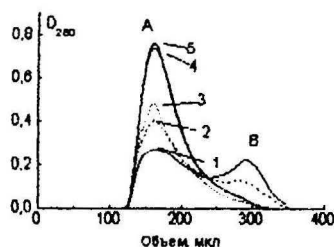


Рис.2. Хроматографический профиль реакционной смеси диальдегиддекстран - РНКазы Vi на колонке с сефадексом G-100. А-РНКазы Vi-ДАД; В- РНКазы Vi. Продолжительность модификации, час: 1-0,5; 2-1; 3-3; 4-5; 5-6 часов. Свободный объем колонки, определенный по Blue Dextran 2000 составляет 75 мл

Зависимость числа точек связывания рибонуклеазы с диальдегиддекстраном от времени модификации (рис.1) показывает, что связывание фермента с носителем происходит и после образования комплекса фермент - носитель. Это увеличение числа точек связывания может происходить двумя способами - увеличением числа молекул носителя, связанных с одной молекулой фермента преимущественно одной связью, и, соответственно, увеличением молекулярной массы модифицированного фермента или путем увеличения числа связей между одной молекулой носителя и одной молекулой фермента. При гель-фильтрации реакционной смеси на сефадексе G-100 не наблюдалось изменение объема элюции модифицированного фермента при варьировании времени модификации (рис 2). Это свидетельствует о том, что взаимодействие РНКазы Vi с диальдегиддекстраном протекает по внутримолекулярному механизму. При увеличении числа связей фермент - носитель происходит увеличение температуры денатурации и уменьшение термостабильности фермента. Модифицированный фермент с большим числом связей характеризуется меньшей удельной активностью.

Разработанную методику получения РНКазы Vi-ДАД использовали для получения препаратов РНКазы Vi модифицированной диальдегиддекстраном с последующим введением различных функциональных групп. Для введения положительного заряда использовали гидроксиламин (препарат РНКазы Vi-ДАД⁺), введение отрицательного заряда в диальдегиддекстрановую матрицу проводили обработкой бисульфитом натрия (РНКазы Vi-ДАД⁻) [Теникова и др., 1980]. Для изменения гидрофобности матрицы использовали диэтилпарафенилдиамин, фенилбуталамин и пенти-

ламин (препараты РНКазы Vi-ДАД-ДЭФДА, РНКазы Vi-ДАД-ФБА и РНКазы Vi-ДАД-ПА). Все препараты синтезируются с достаточно высоким выходом по белку (свыше 80%) и сохранением высокой ферментативной активности (15-60%).

Известно, что в белках фотоокислению могут подвергаться остатки гистидина, тирозина, метионина, и цистеина [Meals, Fessenden, 1971]. Серосодержащие аминокислотные остатки в составе молекулы РНКазы Vi отсутствуют [Афанасенко и др., 1979], а оптимальные условия для окисления остатков гистидина РНКазы не совпадают с таковыми для окисления остатков тирозина, следовательно, потенциальным побочным объектом фотоокисления в молекуле РНКазы Vi при pH 7,5 могут оказаться лишь остатки триптофана, реакционная способность которых не имеет выраженной pH зависимости [Meals, Fessenden, 1971].

Фотоокисление РНКазы сопровождается инактивацией фермента, причем процесс инактивации подчиняется кинетике реакции первого порядка. Кинетические параметры инактивации РНКазы практически не изменяются в диапазоне концентраций метилсиневого 0,002-0,0125%. Кинетика инактивации при этом идентична кинетике накопления инактивированного продукта (остаточная активность менее 0,1%) с окисленным остатком гистидина. Побочное фотоокисление происходит после достижения 50% глубины инактивации фермента в реакционной смеси (рис 3).

Выделение фотоокисленной РНКазы Vi (РНКазы Biin) из реакционной смеси проводили путем хроматографии последней на фосфоцеллюлозе в условиях использованных для разделения продуктов ацилирования РНКазы [Голубенко и др., 1982]. При этом наряду с отделением фотосенсибилизатора происходит эффективное фракционирование продуктов фотоокисления фермента (рис 4). Симметричность белковых пиков, соответствующих фотонинактивированной и каталитически активной фракциям РНКазы, свидетельствует об их хроматографической гомогенности. Хроматографическое поведение фотонинактивированной РНКазы свидетельствует о понижении сродства модифицированного фермента к фосфоцеллюлозе. Таким образом, очевидно, что фотоокислению подвергается фосфат-связывающий участок активного центра РНКазы Vi (His101).

Согласно данным аминокислотного анализа фракций 1 и 3 проведенных Шляпниковым С.В. (Институт молекулярной биологии РАН, Москва), в молекуле фотонинактивированной РНКазы отсутствует гистидин и увеличивается содержание аспарагиновой кислоты, содержание остальных остатков не изменяется. Количественная оценка содержания триптофана показала, что его уменьшение в обеих фракциях не

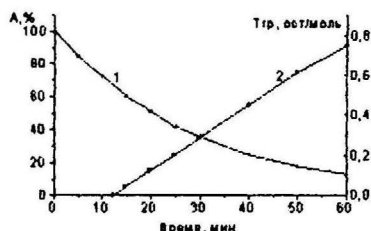


Рис.3. Зависимость остаточной рибонуклеазной активности реакционной смеси (A) от времени фотоокисления РНКазы Vi (1) и динамика окисления остатков триптофана (Tgr) (2)

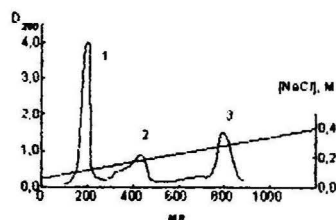


Рис.4. Хроматография продуктов фотоокисления РНКазы Vi на фосфоцеллюлозе P-11. 1- фотоннактивированная РНКазы Vi, 2-метилселевый синий, 3-каталитически активная РНКазы Vi

превышает 0,10-0,15 остатка, т.е. находится на уровне ошибки определения. Таким образом, различия в аминокислотном составе фотоннактивированного и нативного фермента минимальны и касаются практически только His101 активного центра, который окисляется до аспарагиновой кислоты.

Одним из критериев сохранения нативной структуры молекулы РНКазы в целом является способность модифицированного по остатку гистидина фермента образовывать комплекс с нуклеотидом, поскольку взаимодействие His101 с фосфорилированным фрагментом 3'-ГМФ хотя и увеличивает прочность связывания, однако не является решающим для комплексообразования [Карпейский и др., 1981; Голубенко и др., 1982]. Разностный УФ-спектр, индуцируемый при образовании комплекса фотоннактивированной РНКазы с 3'-ГМФ, по форме аналогичен спектру, полученному при взаимодействии лиганда с нативным ферментом. Из анализа зависимости интенсивности поглощения в разностном спектре комплекса фотоннактивированной РНКазы с 3'-ГМФ от концентрации нуклеотида при постоянной концентрации белка следует что фотоннактивированная РНКазы, как и нативный фермент [Карпейский и др., 1981] имеет один центр связывания, а качественное подобие разностных УФ-спектров, возникающих при комплексообразовании препаратов фотоннактивированной и нативной РНКазы с 3'-ГМФ, свидетельствует об отсутствии существенных изменений в структуре молекулы при фотоокислении. Значения константы связывания лиганда с фотоннактивированной РНКазой (K_d $3,8 \times 10^4$ M^{-1}) примерно в 15 раз ниже, чем константа соответствующего комплекса с нативной РНКазой (K_d $6,3 \times 10^5 M^{-1}$).

Весьма незначительные различия в температуре денатурации (T_d) и энтальпии денатурации (ΔH^{den}) для нативного и фотоокисленного фермента в ацетатном буфере позволяют предположить, что при фотоокислении гистидина не происходит существенных изменений в конформации белка. Сопоставление температур денатурации нативного и фотоокисленного препаратов в фосфатном и ацетатном буферах (табл. 2), показывает, что хотя стабилизирующее действие фосфата проявляется как для нативного, так и фотоокисленного ферментов, T_d значительно увеличивается для нативного фермента (на 8°C). Следовательно, взаимодействие фосфат-иона с гистидином активного центра нативного фермента стабилизирует структуру белка. Разрушение остатка гистидина в молекуле фотоинактивированной РНКазы приводит к уменьшению стабилизации.

Таблица 2

Калориметрические параметры термоденатурации нативной и фотоокисленной РНКазы Vi

Среда	Препарат	$T_d, ^\circ\text{C}$	$\Delta H^{den}, \text{кдж/моль}$
0,05M фосфат pH 4,5	РНКазы Vi	60,8	588
	РНКазы Viin	56,0	550
0,05M ацетат pH 4,5	РНКазы Vi	52,8	565
	РНКазы Viin	52,2	562

Глутаровый альдегид широко применяется как бифункциональный реагент при модификации белков [Муронен, Наградова, 1984]. Мы исследовали влияние на модификацию РНКазы Vi глутаровым альдегидом следующих факторов: соотношение глутаровый альдегид/фермент, концентрация фермента и продолжительность реакции модификации.

Как следует из таблицы 3, при концентрации белка 0,25 мг/мл обнаружены производные РНКазы (РНКазы Vi-ГА) с молекулярной массой 8,7 кДа - меньшей, чем у мономера РНКазы и промежуточной между мономером и димером (около 17 кДа), т.е. некротной молекулярной массе нативного фермента (М.М РНКазы Vi 12,3 кДа). Мы полагаем, что в этих случаях в молекуле РНКазы глутаровый альдегид образует внутримолекулярные сшивки [Казанская и др., 1975], что препятствует разворачиванию белка в ДДС Na и, вследствие этого, молекулярная масса этих производных определяется как некротная молекулярной массе нативного фермента, несмотря на то, что эти производные представляют собой мономер и димер РНКазы.

Таблица 4

Физико-химические свойства и цитотоксичность *in vitro* модифицированных мономерных производных РНКазы Vi

Препарат	ОФА	Касс	Rf	T _d , °C	УЦ	ОЦ	ОЦ/ОФА
РНКаза Vi	1,00	1	1	55,2	63,3	1,00	1,0
РНКаза Viin	0,01	0,09	1,0	55,0	0,6*	0,0095*	0,95±0,03
РНКаза Vi-ГА	0,59	2,4	1,0	-	0,0*	0,0*	0,0±0,4*
РНКаза Vi-Сц	0,75	0,06	-1,15	49,0	12,5*	0,20*	0,25 ±0,04*
РНКаза Vi-Эт	0,98	2,9	1,15	54,5	63,1	1,00	1,0 ±0,1
РНКаза Vi-ДМСИ	0,87	2,2	1,15	55,3	66,6	1,05	1,2 ±0,2

диальдегиддекстраном могут являться также стерические препятствия при взаимодействии РНКазы Vi с РНК. Модификация рибонуклеазы вероятно приводит к нарушению нативной структуры белка - частичному разворачиванию белка, что подтверждается уменьшением ΔH^{max} для РНКазы Vi-ДАД. Введение в окружение модифицированной РНКазы отрицательного заряда (РНКаза Vi-ДАД) вызывает дальнейшее снижение ΔH^{max} вероятно вследствие дальнейшего искажения структуры РНКазы вследствие образования дополнительных нековалентных связей между носителем и ферментом.

Возникновение дополнительных электростатических связей между рибонуклеазой и носителем может объяснить и данные по остаточной активности модифицированных ферментов после их инкубации при 65° С. Модифицированная рибонуклеаза с дополнительными функциональными группами в матрице в начале инкубации более стабильна, чем фермент с немодифицированной матрицей. Возможно, это связано с образованием дополнительных электростатических или гидрофобных связей между рибонуклеазой и носителем и (или) стерическими препятствиями для денатурации при введении дополнительных функциональных групп, что отражается и на повышении температуры денатурации. Поэтому, введение в матрицу объемного гидрофобного арильного радикала оказывает наибольшее стабилизирующее действие при инкубации афермента при 65° С. Вместе с тем взаимодействие фермента с матрицей при денатурации фермента может фиксировать структуру фермента и при его разворачивании (при денатурации), затрудняя ренатурацию. Вероятно, это и проявляется после четырехчасовой инкубации: ферментативная активность заряженных форм становилась существенно ниже нейтрального варианта. Увеличение температуры денатурации модифицированной диальдегиддекстраном РНКазы Vi с увеличением числа связей фермент - носитель также свидетельствует об увеличении заторможенности конформационных изменений при модификации.

Цитотоксичность модифицированных препаратов РНКаз

Ранее было показано, что цитотоксичность нативных ферментов РНКазы А и РНКазы В_i обусловлена их каталитической активностью [Куриненко, 1991]. Это было продемонстрировано сравнением цитотоксичности нативного фермента и его менее токсичного фотоннактивированного производного без учета количественных показателей зависимости цитотоксичности от каталитической активности. В качестве такового показателя мы использовали параметр ОЦ/ОФА, который позволяет оценить отношение кратности изменения удельной цитотоксичности к удельной активности фермента вследствие его модификации. Хорошо совпадающие значения этого параметра для нативной и фотоокисленной РНКазы (табл.4) свидетельствуют о том, что удельная цитотоксичность фотоокисленной РНКазы снижается во столько раз, во сколько раз снижается удельная активность фермента, а незначительная цитотоксичность РНКазы В_iin обусловлена ее остаточной активностью. Это свидетельствует о пропорциональности изменения цитотоксичности и каталитической активности фермента вследствие его фотоокисления и о том, что единица ферментативной активности РНКазы В_i и РНКазы В_iin обладает одинаковой цитотоксичностью.

У всех без исключения модифицированных препаратов РНКазы В_i отмечено изменение Касс с гуаниловым нуклеотидом (табл.4). Не исключено, что изменение Касс с нуклеотидом может привести к изменению активности РНКазы и изменению предпочтительности к разрываемым фосфодиэфирным связям, образуемым с участием гуанилового нуклеотида. Из таблицы 4 следует, что Касс не коррелирует с активностью модифицированных препаратов РНКазы и, следовательно, ее нельзя рассматривать как причину уменьшения их активности. Таким образом, изменения Касс не может быть опосредованной (через активность) причиной снижения цитотоксичности модифицированных препаратов фермента. Нельзя исключать, что изменения Касс модифицированных препаратов РНКазы В_i могут отражать особенности их суб-

Таблица 5

Влияние способа введения гидрофобного амина на физико-химические свойства и цитотоксичность *in vitro* модифицированных препаратов РНКазы В_i

Препарат	ЧТС	ОФА	σ , дин/см	УЦ	ОЦ	ОЦ/ОФА
РНКазы В _i	0	1,00	70,5	$18 \pm 2,3$	$1,0 \pm 0,13$	$1,0 \pm 0,13$
РНКазы В _i -ДАД	3,0	0,35	71,6	$0,02 \pm 2,0^*$	$0,0 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,1^*$
РНКазы В _i -ДАД-ФБА	2,7	0,40	68,7	$0,7 \pm 1,5^*$	$0,0 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,1^*$
РНКазы В _i -ДАД-ПА	2,5	0,44	67,1	$14,5 \pm 4,2$	$0,80 \pm 0,25$	$1,8 \pm 0,52$
РНКазы В _i -ГА	3,0	0,60	69,2	$0,2 \pm 1,2^*$	$0,0 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,1^*$
РНКазы В _i -ГА-ФБА	2,8	0,64	65,6	$78 \pm 7,8^*$	$4,3 \pm 0,23^*$	$6,7 \pm 0,73^*$
РНКазы В _i -ГА-ПА	2,5	0,49	64,2	$88 \pm 4,4^*$	$4,9 \pm 0,24^*$	$10,0 \pm 0,67^*$

стратной специфичности. Из данных таблицы 4 следует, что корреляция между Касс и параметрами, характеризующими цитотоксические свойства препаратов, отсутствуют. Таким образом, если изменения Касс с нуклеотидом свидетельствуют об изменении субстратной специфичности (изменении предпочтительности к разрываемым фосфодиэфирным связям) фермента, следует признать, что изменения субстратной специфичности не оказывают влияния на токсические свойства РНКазы. Из вышеизложенного следует, что Касс модифицированных препаратов РНКазы Vi с гуаниловым нуклеотидом независимо от ее возможной связи с субстратной специфичностью фермента незначима для их цитотоксических свойств.

Из идентичности макромолекулярной организации РНКазы Vi и РНКазы Biiп и их физико-химических свойств, о чем свидетельствуют наши данные и данные иммунологического родства этих ферментов, полученные Нехорошковой и др., [1988], следует, что различия в их цитотоксичности обусловлены различиями в активности (числе оборотов фермента), с чем согласуется корреляция между изменениями показателей удельной цитотоксичности и каталитической активности. Обобщенным свидетельством этой корреляции является совпадение значений параметра ОЦ/ОФА нативного и фотоокисленного ферментов. Следовательно отклонение значений этого параметра у некоторых препаратов фермента с измененными физико-химическими свойствами от аналогичного показателя нативного фермента, достаточно надежно свидетельствует о влиянии этих изменений на каталитически обусловленную цитотоксичность. Анализ влияния изменений структуры и физико-химических свойств полученных нами препаратов РНКазы Vi на их цитотоксичность позволяет сделать следующие обобщения.

Этанолоамидирование РНКазы или модификация РНКазы диметилсуберинидом существенно не изменяют удельную цитотоксичность препаратов. Относительная ферментативная активность в первом случае остается неизменной, во втором - снижается весьма незначительно (табл. 4), относительная каталитическая цитотоксичность в обоих случаях близка к 1,0. Таким образом, все эти случаи не выходят за рамки представлений о прямой зависимости цитотоксичности от каталитической активности фермента и свидетельствуют либо о незначимости увеличения суммарного положительного заряда РНКазы Vi для увеличения ее цитотоксичности, либо о недостаточной степени увеличения заряда.

Для препарата РНКазы Vi-Сц наблюдается значительное снижение показателя ОЦ/ОФА, несмотря на высокий уровень сохранения ферментативной активности мо-

дифицированного препарата фермента. Исходя из незначимости Касс с 3'-ГМФ для цитотоксичности модифицированных препаратов РНКаз, следует предположить, что наиболее вероятная причина уменьшения цитотоксических свойств РНКазы Vi-Сд заключается в том, что для отрицательно заряженного препарата модифицированного фермента мишень, находящаяся на отрицательно заряженной плазматической мембране становится менее доступной в силу электростатического отталкивания фермента от мембраны.

Наиболее вероятной причиной отсутствия цитотоксичности препарата РНКазы Vi-ГА, является то, что вследствие восстановления глутаральдегидных тримстеров они превращаются в электронейтральные "хвосты", которые подобно диальдегиддекстрановой матрице создают стерические препятствия для взаимодействия фермента с плазматической мембраной клетки. В результате молекулярная мишень фермента в плазматической мембране становится недоступной действию препарата РНКазы Vi-ГА подобно препарату РНКазы Vi-ДАД (табл.5). Отсутствие цитотоксичности в тесте с НКр диальдегиддекстрановых производных РНКазы (РНКазы Vi-ДАД-ФБА и РНКазы Vi-ДАД), вероятно, связано с экранированием объемной декстрановой матрицей структур РНКазы, обеспечивающих взаимодействие фермента с клеткой.

Цитотоксичность диальдегиддекстрановых производных *in vivo* выше чем *in vitro*, что может быть следствием опосредованного воздействия РНКазы на опухолевый процесс [Куряненко, 1991].

Как следует из таблицы 5 введение в молекулу РНКазы гидрофобных групп - остатков апиламина или ариламина, уменьшает поверхностное натяжение растворов препаратов и приводит к увеличению их цитотоксичности. Для выяснения вопроса не связано ли изменение цитотоксичности этих препаратов с проявлением цитотоксического действия пентиламина, исследовалась цитотоксичность гидрофобизированной пентиламином через глутаровый альдегид нативной и фотоокисленной по Нис101 РНКазы Vi. Из таблицы 6 следует, что препарат гидрофобизированной пентиламином нативной РНКазы токсичнее нативного фермента. Гидрофобизирование фотоокисленной РНКазы не привело к увеличению (проявлению) токсичности фермента даже при концентрации, превышающей концентрацию нативного фермента в 10 раз и содержащей в 10 раз большее количество моноамина. Следовательно моноамин не вносит заметного вклада в токсичность гидрофобизированной рибонуклеазы. Поэтому есть все основания полагать, что увеличение цитотоксичности гидрофобизированных препаратов обусловлено не наличием апиламина, а связано с изменением физи-

Таблица 6

Физико-химические свойства и цитотоксичность *in vitro* нативной и фото-окисленной РНКазы Vi, модифицированных пентиламином

Препарат	ЧТС	ОФА	σ , дин/см	УЦ	ОЦ	ОЦ/ОФА
1 мкг/мл						
РНКазы Vi	0	1,00	70,5 \pm 0,1	9,5 \pm 2,5	1 \pm 0,2	1 \pm 0,26
РНКазы Vi-ГА-ПА	1,3	0,80	65,1 \pm 0,2	17,5 \pm 1,9*	1,84 \pm 0,27*	2,3 \pm 0,27*
10 мкг/мл						
РНКазы Viin	0,0	0,01	70,6 \pm 0,1	0,1 \pm 0,14	0,01 \pm 0,15	1,053 \pm 1,4
РНКазы Viin-ГА-ПА	1,8	0,008	65,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,24	0,03 \pm 0,025	3,9 \pm 3,2
100 мкг/мл						
РНКазы Viin	0,0	0,01	70,6 \pm 0,1	0,085 \pm 0,04	0,009 \pm 0,004	0,9 \pm 0,4
РНКазы Viin-ГА-ПА	1,8	0,008	65,3 \pm 0,2	0,21 \pm 0,06*	0,022 \pm 0,06*	2,8 \pm 0,8*

ко-химических свойств модифицированной РНКазы, способствующих увеличению эффективности ее взаимодействия с плазматической мембраной клеток.

Близость значений ОЦ/ОФА для гидрофобизированной фотонинактивированной РНКазы, рассчитанных по данным цитотоксичности препарата в концентрации 100 мкг/мл и гидрофобизированного нативного фермента (определена в концентрации 1 мкг/мл), также свидетельствует о влиянии гидрофобизации преимущественно на каталитически обусловленную цитотоксичность (табл.6).

Гидрофобизация РНКазы алкиламинами разной длины (этиламином и пентиламином) не привела к достоверному различию в цитотоксичности препаратов, имеющих приблизительно равное количество связей РНКазы - спейсер, хотя различия в их гидрофобности значимы (табл. 7). Вместе с тем наблюдается достоверное увеличение цитотоксичности гидрофобизированных препаратов РНКазы с возрастанием количества модифицированных аминогрупп (количества присоединенного алкиламина) (табл. 7). Эти данные свидетельствуют о том, что для проявления цитотоксичности фермента более важна плотность гидрофобных групп на поверхности белковой

Таблица 7

Влияние количества гидрофобизирующего алкиламина и длины его цепи на физико-химические свойства и цитотоксичность *in vitro* модифицированных препаратов РНКазы Vi

Препарат	ЧТС	ОФА	σ , дин/см	УЦ	ОЦ	ОЦ/ОФА
РНКазы Vi	0	1,0	70,5 \pm 0,1	11,2 \pm 3,6	1 \pm 0,32	1 \pm 0,31
РНКазы Vi-ГА-ЭА-1	1,17	0,78	65,6 \pm 0,2	20,7 \pm 2,3*	1,85 \pm 0,2*	2,37 \pm 0,27*
РНКазы Vi-ГА-ЭА-2	2,29	0,45	65,2 \pm 0,2	29,1 \pm 4,6*	2,6 \pm 0,4*	5,8 \pm 0,96*
РНКазы Vi-ГА-ЭА-3	2,44	0,40	64,9 \pm 0,2	33,2 \pm 5,5*	2,97 \pm 0,5*	7,4 \pm 1,22*
РНКазы Vi-ГА-ПА-1	1,26	0,76	61,6 \pm 0,2	19,9 \pm 4,4*	1,78 \pm 0,4*	2,34 \pm 0,53*
РНКазы Vi-ГА-ПА-2	1,78	0,60	61,3 \pm 0,2	22,7 \pm 2,2*	2,03 \pm 0,2*	3,38 \pm 0,35*
РНКазы Vi-ГА-ПА-3	2,04	0,43	59,8 \pm 0,2	39,3 \pm 5,5*	3,51 \pm 0,5*	8,16 \pm 1,21*

Таблица 8.

Физико-химические свойства и цитотоксичность *in vitro* полимерных производных РНКазы Vi

Препарат	ОФА	Касс	Rf	Выход K ⁺	УЦ	ОЦ	ОЦ/ОФА
РНКазы Vi	1,00	1	1	1,0	63,3	1,00	1,0±0,1
РНКазы Vi-ДМСИ-димер	0,32*	1,3*	0,9*	2,1*	77,0*	1,22*	3,7±0,5*
РНКазы Vi-ДМСИ-полимер	0,28*	>10*	0*	4,4*	83,7*	1,32*	4,6 ±0,5*

молекулы, а не длина алкильного остатка.

Димеризация и полимеризация РНКазы Vi, так же как и в случае с РНКазой A [Kooistra et al., 1979], сопровождается уменьшением каталитической активности в отношении классического субстрата - одцепочечной РНК. Показатели характеризующие токсические свойства (УЦ, ОЦ/ОФА, выход из клетки ионов K⁺) димера и полимера выше, чем у нативного фермента и модифицированных мономерных негидрофобизированных производных РНКазы Vi (табл.4 и табл.8). Возможно, эти отличия связаны с различиями механизма цитотоксичности мономерной РНКазы Vi и димерных форм РНКаз (РНКазы BS). Вместе с тем, массивное истечение из клеток ионов K⁺ в присутствии полимерных производных, которое принято считать следствием нарушения функции мембраны, дает основание предположить, что у полимерных производных РНКазы Vi плазматическая мембрана сохраняет свое значение в качестве мишени при взаимодействии с клеткой. Касс полимера РНКазы на порядок выше Касс димера. В то же время показатели токсичности димера и полимера достоверно не различаются. Это свидетельствует о том, что величина Касс полимерных производных фермента, как и в случае с мономерными модифицированными препаратами РНКазы, не существенна для их цитотоксичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные о возможности изменения цитотоксических свойств РНКазы *B.intermedius* в широком диапазоне показателей с помощью химической модификации фермента свидетельствуют о плодотворности использованного подхода. Этот подход открывает возможность значительно расширить ассортимент препаратов РНКазы для использования их в качестве биологически активных веществ, что позволит ему успешно конкурировать со скринингом ферментов из различных природных источников.

С помощью химической модификации можно успешно дискриминировать одни биологические эффекты с сохранением других. Эта возможность наглядно продемон-

стрирована на примере фотоокисленной РНКаза Vi - препарат модифицированного фермента практически не обладает цитотоксичностью и другими каталитически обусловленными эффектами, но сохранил каталитически независимую биологическую активность [Куриненко, 1991].

Слаботоксичные высокоактивные препараты РНКаза (РНКаза Vi-Сц, РНКаза Vi-ГА, РНКаза Vi-ДАД) представляют несомненный интерес как потенциальные противовирусные препараты. Высокий уровень РНКазной активности, который может быть достигнут с помощью высокоактивных малотоксичных препаратов фермента может обеспечить эффективный противовирусный барьер во внутренней среде организма. Такой барьер может существенно ограничить генерализацию инфекции дефектным пострепродуктивным вирусным потомством чувствительным к рибонуклеазе, составляющим в зависимости от вида вируса от 50% до 90% потомства вируса [Максимович, Лисовая, 1969; Максимович и др., 1969].

Гидрофобизированные производные РНКаза Vi требуют более углубленных исследований как потенциальные биологически активные вещества. Их использование может оказаться перспективным в медицине и биотехнологии, так как в соответствии со следствиями, вытекающими из правила обратного действия Arndt-Schulz'a [Мейер, Готлиб, 1940] для веществ, обладающих токсическим эффектом, есть основания ожидать, что положительные эффекты фермента у гидрофобизированных производных будут наблюдаться при более низких концентрациях, чем у нативного фермента. Это можно прогнозировать основываясь на том, что увеличение цитотоксичности фермента при гидрофобизации не связано с токсичностью гидрофобизирующих групп.

Наконец расширение спектра модифицированных препаратов фермента и более детальное исследование их структурных, энзиматических свойств и биологической активности позволит сформулировать четкие критерии зависимости "структура /энзиматические свойства /биологическая активность".

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ модификации рибонуклеазы *B.intermedius* диальдегид-декстраном, позволяющий оптимизировать условия модификации с помощью обобщенного формализованного параметра, включающего в себя выход модифицированного фермента по белку и стабильность нативного фермента при условиях модификации.

2. Разработан способ селективного фотоокисления РНКазы *B.intermedius* по His101 активного центра. Фотоокисленный фермент является структурным аналогом нативной РНКазы.

3. Цитотоксические свойства РНКазы *B.intermedius*, модифицированной объемной декстрановой матрицей или тримером глутарового альдегида резко снижаются при сохранении высокой каталитической активности.

4. Изменение физико-химических свойств РНКазы *B.intermedius*, оказывает влияние на каталитически обусловленную цитотоксичность. Изменение Касс фермента с 3'-ГМФ вследствие модификации фермента не существенно для его цитотоксичности.

5. Увеличение суммарного положительного заряда РНКазы *B.intermedius* не оказывает влияния на цитотоксические свойства фермента, тогда как увеличение суммарного отрицательного заряда сопровождается их снижением.

6. Цитотоксичность РНКазы *B.intermedius* возрастает при ее гидрофобизации - в большей степени при введении в молекулу фермента алкильных, а не ароматических радикалов. Увеличение цитотоксичности при гидрофобизации алкиламинами обусловлено не токсичностью последних, а изменением физико-химических свойств модифицированного фермента.

7. Цитотоксичность димеров и полимерных форм РНКазы *B.intermedius* выше цитотоксичности нативного фермента, что позволяет использовать их в качестве аналогов РНКазы BS или искусственно димеризованной панкреатической РНКазы в мидко-биологических исследованиях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Davydov R.E. Kurinenko B.M. Ribonuclease *Bac. intermedius* modified by dialdehyddextran. // 15th FEBS Meeting Abstracts Brussel, Belgium.-1983.- P.276 (S-11,W.E.-100)

2. Фотоокисленная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P и получение фотоннактивированного препарата фермента / Б.М. Куриненко, И.А. Голубенко, Р.Ш. Булгакова, Р.Э. Давыдов, З.М. Нехорошкова, С.Ф. Валиуллина, С.В. Шляпников // Биорг.химия 1986.-Т.12.-N4.-С. 457-466.

3. Agistidiny1-101 RNase *B.intermedius* 7P production. Conformity of RNase's derivative to native enzyme / B.M. Kurinenko, I.A. Golubenko, R.Sh. Bulgakova, R.E. Davydov, Z.M. Nechoreshkova, S.Ph. Valiullina, S.V. Shlyapnikov // in: Proceedings of the First international Meeting Structure and Chemistry of ribonucleases (Eds. A. Pavlovsky., K.Polyakov) Moscow.-1989.-p.342-348.

4. Собчук Л.И., Давыдов Р.Э., Булгакова Р.Ш., Карпова С.И. Изучение влияния модификации функциональных групп в рибонуклеазе *Bac. intermedius* на ее биологическую активность // Тез. Докл. Межресп. совещания "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование". - Рига, ЛГУ. - 1989. - С.70

5. Влияние производных бактериальной рибонуклеазы на выход ионов калия из клеток саркомы 37/ Куриненко Б.М., Давыдов Р.Э., Собчук Л.И., Булгакова Р.Ш., Карпова С.И. // Тез. Докл. Межресп. совещания "Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование". - Рига, ЛГУ. - 1989. - С.74

6. А.С.1592334 (СССР). Агистадинил - РНКазы *Bac.intermedius* 7Р /Б.М. Куриненко, Р.Ш. Булгакова, З.М. Нехорошкова, Л.И. Собчук, Е.В. Сергеева, Р.Э. Давыдов -1990.

7. Куриненко Б.М., Давыдов Р.Э. Модификация рибонуклеазы *Bac. intermedius* двальдсиддкстраном.// Прикладная биохимия и микробиология, 1996, вып 3, С. 303-306

8. Куриненко Б.М., Давыдов Р.Э., Булгакова Р.Ш. Химическая модификация РНКазы *Bac.intermedius*. Влияние на цитотоксические свойства фермента. // Антибиотики и химиотерапия. - 1996. - т.40, N7-8. - С.9-12.

9. Куриненко Б.М., Давыдов Р.Э., Булгакова Р.Ш. Связь энзиматических свойств модифицированных препаратов РНКазы *Vi* с их цитотоксичностью.// Тез.докладов Второго съезда биохимического общества РАН, Пущино, 1997. - С. 40.

10. Куриненко Б.М., Давыдов Р.Э., Булгакова Р.Ш. Химическая модификация рибонуклеазы *Bacillus intermedius*. Влияние гидрофобизации на цитотоксичность фермента.// Ферменты микроорганизмов. XI Всероссийская конференция. Сборник докладов. - Казань: УНИПРЕСС, -1998. - С.233-238.

11. Kurinenko B.M., Bulgakova R.Sh., Davydov R.E. Effect of ribonuclease from *Bacillus intermedius* on human blood lymphocytes. //FEMS Immunology and medical microbiology. - 1998. - v.21. - p.117-122.

2-00

Подписано в печать 24.04.2000. Формат 60х84/16
Усл. печ. л. 1,5. Дог. № 11 Тираж 70
Лаборатория оперативной печати ТГПИ
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373